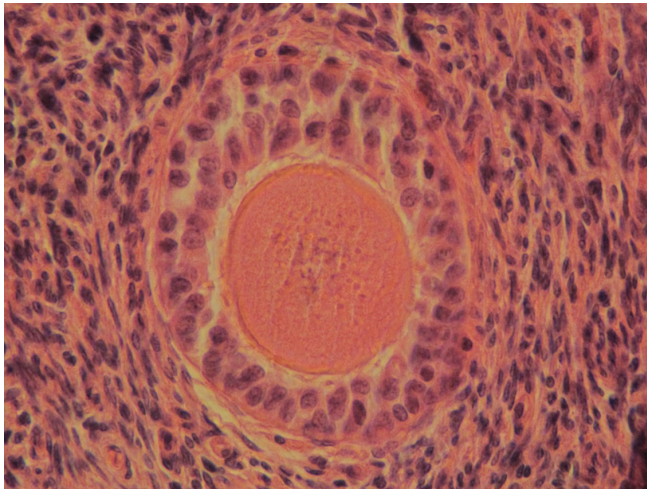


Foto: Marcio Calixto Matias



## Protocolo para Caracterização Histológica do Ovário de Ovinos

Valesca Barreto Luz<sup>1</sup>

Carollina Florido Pires<sup>2</sup>

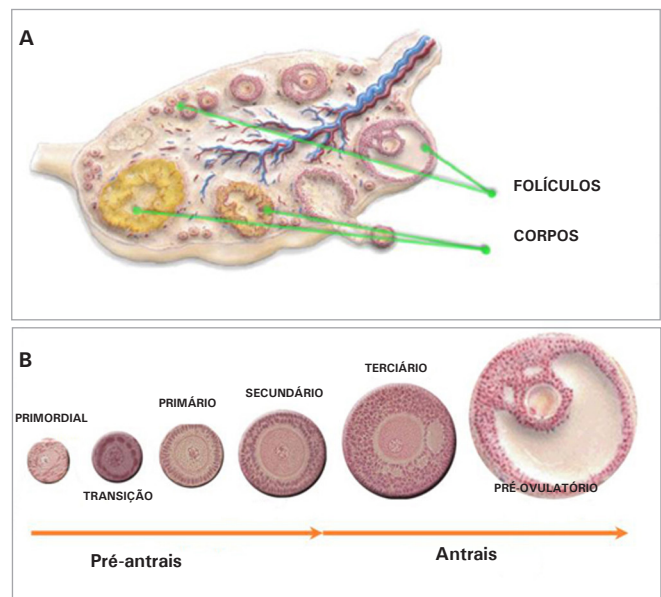
Marcio Calixto Matias<sup>3</sup>

Hymerson Costa Azevedo<sup>4</sup>

### Introdução

O ovário dos mamíferos é composto por duas porções, uma cortical e uma medular que, na maioria das espécies animais como a ovina, são localizadas na periferia e no centro da gônada respectivamente. O córtex é constituído de tecido conjuntivo que compõe o estroma, com células do estroma e folículos ovarianos que, por sua vez, são compostos por um oócito e células foliculares oriundas do epitélio mesotelial e mesonefro. A medula é composta por tecido conjuntivo frouxo vascularizado, onde estão presentes fibroblastos, colágeno (fibras elásticas), vasos sanguíneos, vasos linfáticos e fibras nervosas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013) como demonstrado na Figura 1. O folículo ovariano é a unidade morfofuncional do ovário, sendo classificado como pré-antral ou não cavitário (primordial, transição, primário e secundário) e antral ou cavitário (terciário e pré-ovulatório), caracterizado pela presença de uma cavidade repleta de líquido folicular denominada antro (FIGUEIREDO et al., 2003). Os folículos primordiais caracterizam-se por um oócito circundado por células da granulosa de formato pavimentoso e podem permanecer quiescentes por tempo indeterminado ou imediatamente iniciarem o seu desenvolvimento (KNIGHT; GLISTER, 2006).

Ilustração - Figura A: Valesca Barreto Luz



**Figura 1.** Ovário de mamífero e categorias foliculares.

Fonte: Figura B - adaptada de Orisaka et al. (1999).

Um folículo é considerado como de transição quando possui pelo menos três células cúbicas ao redor do oócito. Quando uma camada completa de células da granulosa circunda o oócito, os folículos passam a ser chamados de primários. Com o desenvolvimento do folículo, as células da granulosa aumentam em número

<sup>1</sup>Médica Veterinária, doutora em Biotecnologia, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE

<sup>2</sup>Graduanda em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Sergipe, bolsista PIBIT-FAPITEC/Embrapa Tabuleiros Costeiros, São Cristóvão, SE

<sup>3</sup>Graduando em Medicina Veterinária, Faculdade Pio Décimo, bolsista PIBIT-FAPITEC/Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE

<sup>4</sup>Médico Veterinário, doutor em Reprodução Animal, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE

e tornam-se mais volumosas, culminando com a formação do folículo secundário (MOHAMMDPOUR, 2007), o qual é caracterizado pela presença de duas ou mais camadas de células da granulosa cúbicas. Neste estágio, a zona pelúcida é claramente identificada ao redor do oócito e as células da teca começam a ser recrutadas a partir do estroma ovariano (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Com o crescimento do folículo secundário e a intensa proliferação das células da granulosa, ocorre a formação da cavidade antral, estágio no qual os folículos passam a ser denominados terciários ou antrais (DRIANCOURT, 2001). O desenvolvimento dos folículos antrais é caracterizado pelas fases de crescimento, recrutamento, seleção e dominância (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005), que permite a formação de um folículo pré-ovulatório também conhecido como folículo de *Graaf*, que representa o estágio final do desenvolvimento folicular (DRUMMOND, 2006) como demonstrado na Figura 1.

A Histologia é um método clássico que pode ser utilizado na caracterização do ovário pela avaliação da morfologia do citoplasma e do núcleo do oócito, permite ainda verificar o número e as alterações morfológicas de todos os compartimentos foliculares (células da granulosa, da teca e oócito), bem como do estroma ovariano. Tais alterações incluem a desorganização das células da granulosa e seu destacamento da membrana basal, bem como a retração oocitária e a picnose nuclear. A histologia clássica (HC) é importante para avaliação do tecido ovariano que pode ser analisado fresco (logo após a coleta do tecido), após cultivo e após descongelamento. Ela apresenta uma grande vantagem, que é a de possibilitar análises quantitativas e qualitativas de um grande número de folículos (MATOS et al., 2007). Dentre as avaliações está a classificação dos folículos quanto ao seu estágio de desenvolvimento (primordial, transição, primário ou secundário), e ainda quanto às suas características morfológicas (normais ou atresicos). Na análise histológica, as alterações indicativas de atresia em folículos pré-antrais ocorrem primariamente no oócito, sendo a picnose nuclear o primeiro sinal de atresia (SILVA et al., 2002). Esta técnica se mostra sensível para este tipo análise, podendo obter resultados similares aos de viabilidade folicular utilizando marcadores fluorescentes como a calceína e o corante azul de tripan (AMORIM et al., 2003). Além disso, a HC pode ser utilizada para avaliar a morte da célula por necrose, através da visualização da presença de vacúolos (MARTINEZ-MADRID et al., 2007).

A facilidade e rapidez na execução e padronização nas replicações e o baixo custo e pouca demanda em infraestrutura exigida, faz com que a HC seja a técnica mais utilizada na caracterização morfológica dos ovários e suas estruturas. Do ponto de vista prático, a HC permite identificar problemas reprodutivos coletivos ou individuais, a exemplo de carcinomas e hipoplasias, bem como caracterizar e quantificar a população folicular de espécies e raças nativas e, novas espécies e genótipos como os ovinos prolíficos *FecG<sup>E</sup>* portadores de mutações do gene GDF9 que têm ação sobre mecanismos ovarianos (AZEVEDO et al., 2015). Outra aplicação da técnica se dá, além da geração de conhecimento básico, no desenvolvimento de biotécnicas reprodutivas como a produção in vivo e in vitro de embriões por meio do estabelecimento de protocolos mais eficientes de maturação e fertilização de oócitos, cultivo e criopreservação de oócitos e embriões, técnicas de explantes/implantes de tecidos, bem como testes nutricionais e toxicológicos, dentre outros.

Apesar da sua importância e vantagens, são raras na literatura informações detalhadas do processamento histológico de ovários de animais que permitam a perfeita replicação da técnica. A maioria das informações disponíveis não possuem muitos dos detalhes de ordem prática que facilitam o dia-a-dia da execução do procedimento na rotina de laboratório.

A metodologia descrita neste trabalho é uma mescla de adaptações e inovações de procedimentos que são descritos de forma detalhada e que melhoram e viabilizam sua replicação em laboratório. Procedimentos nunca descritos como o passo a passo em vídeo de procedimentos como a confecção das forminhas de papel e da fixação do fragmento à lâmina trazem este caráter inovador da metodologia descrita nesta publicação. Não existe na literatura nenhuma publicação similar que organize todos os passos da histologia ovariana de ovinos e que viabilize sua replicação de forma tão detalhada, figurativa e demonstrativa.

Assim, este trabalho tem como objetivo descrever de forma direta uma metodologia detalhada, prática e de fácil replicação para processamento histológico de fragmentos do córtex do ovário utilizado na rotina de pesquisa para caracterização ovariana. A metodologia descrita foi construída e validada ao longo de alguns anos de experiência dos autores em suas trajetórias acadêmicas e de pesquisa contendo instruções com alto nível de detalhamento e representação visual.

## Procedimento histológico ovariano

### Recomendações para proteção individual e geral

- Para a maioria dos procedimentos, utilize os seguintes materiais e equipamentos de proteção individual: luvas de látex para procedimento, jaleco, máscara cirúrgica simples com elástico, óculos de segurança antiembaçante incolor e, capela de exaustão de gases.
- Anterior aos procedimentos realize a identificação de todos os tubos que serão utilizados para coleta, fixação, desidratação e diafanização, descrevendo com detalhe as amostras através de siglas em etiquetas coladas aos tubos.

### Coleta

O ovário pode ser processado inteiro, metade, ou, como descrito no procedimento abaixo, por meio de pequenos fragmentos.

#### Material:

- Cabo (número 4) e lâmina de bisturi (número 22), placa de Petri (100 mm x 15 mm), 1 folha de papel, caneta.

#### Procedimento:

1. Com o auxílio de um bisturi com lâmina, fatie o córtex ovariano em pedaços de aproximadamente 1 mm de espessura e, a partir deles, fatie fragmentos com 3 mm x 3 mm x 1 mm (comprimento, largura e espessura).
2. Coloque os fragmentos numa placa de Petri sobre um pedaço de papel contendo um desenho do modelo do fragmento nas dimensões de 3 mm x 3 mm conforme a Figura 2.

### Fixação

A fixação após a coleta tem o objetivo de preservar a morfologia (composição das células e tecidos) de tal forma que, no momento da avaliação, tenha-se um histórico dos mecanismos que ocorriam no tecido no momento em que foi fixado. Para tanto, a solução fixadora insolubiliza componentes intracelulares, enzimas hidrolíticas e evita autólise. Os principais fixadores para tecido ovariano são a formalina, ácido acético, álcool etílico absoluto, clorofórmio, glutaraldeído, tetróxido de ósmio, Carnoy ou soluções a base desses componentes. O fixador de eleição para histologia ovariana é o Carnoy que é usado na forma de uma solução preparada como descrito a seguir.

#### Material:

- Tubo de ensaio de 5 mL com tampa de borracha e suporte para tubo, 1 L de Carnoy (600 mL de álcool a 100%, 30 mL de clorofórmio e 10 mL de ácido acético), álcool etílico 70% e pipeta Pasteur.

#### Procedimento:

1. Fixe o fragmento imergindo-o em um tubo de ensaio contendo a solução de Carnoy na proporção de 20 vezes o volume da amostra (ver exemplo abaixo) por 12 horas.
2. Exemplo de cálculo do Carnoy - supondo uma amostra de aproximadamente 9 mm<sup>3</sup>:

$$9 \text{ mm}^3 \times 20 \text{ vezes} = 180 \text{ mm}^3$$

$$1 \text{ mm}^3 \rightarrow 0,001 \text{ mL}$$

$$180 \text{ mm}^3 \rightarrow x$$

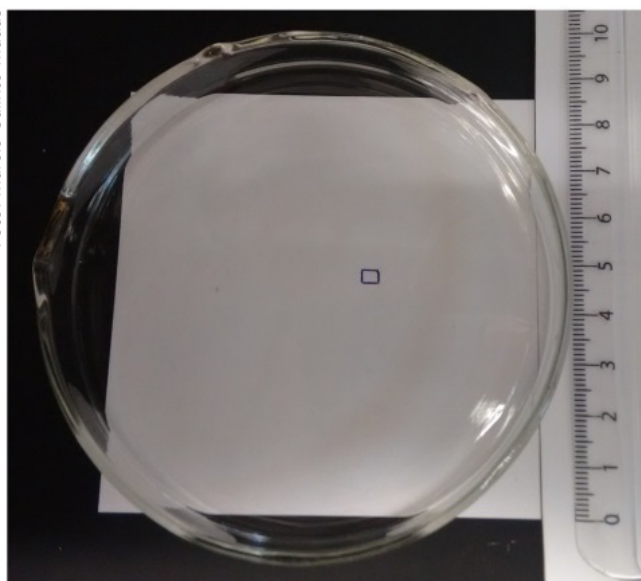
$$x = 0,18 \text{ mL ou } 180 \text{ }\mu\text{L}$$

3. Descarte o fixador e adicione álcool 70%. A partir deste momento a amostra pode ser acondicionada por tempo indeterminado.

#### Recomendações:

- Realize o procedimento utilizando as luvas para procedimento da cor branca, pois as substâncias fixadoras são reconhecidamente tóxicas e desbotam turvando os reagentes quando em contato com eles.
- Em virtude da pequena quantidade de solução fixadora utilize de 500 µL a 1000 µL para facilitar a manipulação. Tanto o cálculo como essa recomendação servem para as demais substâncias utilizadas nas etapas posteriores (álcool, xilol e parafina).

Foto: Marcio Calixto Matias



**Figura 2.** Placa de Petri sobre o papel com o modelo para obtenção de fragmento ovariano para processamento histológico.

- Outro cuidado que deve ser observado é a imersão completa do fragmento na solução fixadora para que a fixação ocorra de forma eficiente.
- O tempo de exposição ao Carnoy deve ser de 12 horas a temperatura ambiente de 26 °C.

### **Desidratação**

A desidratação tem como objetivo remover água do tecido preparando-o para a inclusão em parafina que é imiscível em água. Para tanto, o fragmento de tecido deve ser submetido às imersões sucessivas em soluções com concentrações crescentes de álcool etílico.

Material:

- Papel toalha, cronômetro, suporte para tubos, pipeta Pasteur de 3 mL, béquer de 50 mL, álcool etílico 80%, álcool etílico 95%, álcool etílico 100%.

Procedimento:

1. Organize na haste de suporte os tubos de ensaio contendo os fragmentos de tecido de acordo com a identificação da amostra.
2. Descarte o álcool etílico 70% contido no tubo com o fragmento de tecido da etapa anterior.
3. Adicione álcool etílico 80% em um béquer de 50 mL para facilitar a pipetagem.
4. Com uma pipeta Pasteur adicione o álcool etílico 80% nos tubos de ensaio e marque uma hora no cronômetro.
5. Retire o álcool dos tubos com a pipeta Pasteur e descarte.
6. Descarte e reponha o álcool sucessivamente aumentando sua concentração para 95% e 100% a cada reposição, seguindo como modelo os procedimentos descritos nos itens anteriores 2, 3, 4 e 5.

Recomendações:

- Nas trocas das soluções, coloque a ponta da pipeta Pasteur no fundo do tubo de ensaio para não aspirar o fragmento.
- O tempo deve ser contado ao final no momento em que é trocado o álcool do último frasco.
- Para não haver confusão, recomenda-se realizar as passagens seguindo sempre um mesmo sentido pré-estabelecido a exemplo do mais comumente executado que é o da esquerda para a direita.

### **Diafanização ou clareamento**

O processo de diafanização consiste na imersão do tecido em um produto químico que seja miscível tanto no álcool quanto na parafina e, baseia-se na infiltração do tecido por um solvente da parafina que seja simultaneamente desalcolizante, sendo o xilol comumente utilizado. Essa substância é muitas vezes chamada de agente clarificador, porque torna o tecido semitranslúcido, quase transparente, já que faz a remoção dos seus lipídeos. A duração da diafanização ou clarificação varia de acordo com as dimensões e a constituição do material, além da temperatura ambiente.

Material:

- Béquer de 50 mL, cronômetro, capela de exaustão de gases, caneta marcadora de tubos, folha de papel madeira, suporte para tubos de ensaio e xilol.

Procedimento:

1. Adicione o xilol em um béquer de 50 mL para facilitar a pipetagem.
2. Com uma pipeta Pasteur adicione o xilol nos tubos de ensaio e marque uma hora no cronômetro.
3. Descarte o xilol em um frasco identificado, substitua por um xilol novo e, espere mais uma hora para, em seguida, iniciar o processo de impregnação.

Recomendações:

- A partir dessa etapa é obrigatório realizar os procedimentos sob uma capela de exaustão de gases.
- Verifique se há uma iluminação adequada no interior da capela.
- Tenha o máximo de cuidado nas aspirações do xilol para que o fragmento semitranslúcido não se perca, sendo indicada a utilização de uma superfície que dê contraste como o papel madeira.
- Ao término dessa etapa de diafanização ou clarificação deixe os frascos abertos e luvas utilizadas dentro da capela de exaustão por período mínimo de 2 horas para evaporação do xilol.

### **Impregnação e inclusão**

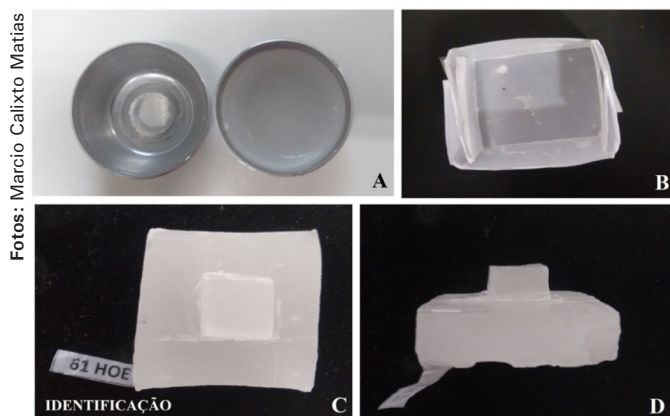
As etapas de impregnação e inclusão têm como objetivo introduzir a parafina nos espaços vazios no tecido, antes ocupados por água e gordura, a fim de dar ao fragmento a sustentação necessária para que sejam realizados os cortes no micrótomo. A impregnação visa remover o clarificante por



evaporação às altas temperaturas ao submeter o fragmento aos primeiros banhos de parafina entre 65 °C e 70 °C. O 3º banho de parafina desta etapa é chamado de inclusão no qual o bloco endurecido será formado.

#### Material:

- Estufa histológica, congelador, cronômetro, béquer, parafina histológica com ponto de fusão de 58 °C a 65 °C, tiras de papel ou etiquetas para identificação das amostras, formas de empada número 4 (Figura 3A), pinça metálica reta ponta serrilhada  $\geq 17$  cm, papel sulfite, estilete.



**Figura 3.** Procedimento de preparação do bloco de parafina com a amostra de tecido para histologia. (A) Forma de empada número 4 para fase de impregnação da parafina. (B) Forminha de papel para fase de inclusão em parafina. (C e D) Modelos de desbaste do bloco de parafina mostrando as dimensões de comprimento e largura e de profundidade.

#### Procedimento:

1. Coloque parafina histológica (10 mL/fragmento) em um béquer na estufa a 60 °C overnight. Ao final deste período ela deverá estar totalmente líquida.
2. Com uma pinça metálica retire o fragmento do tubo de ensaio e coloque-o na primeira forma (Figura 3A) contendo parafina totalmente fundida e com a identificação da amostra correspondente descrita em uma tira de papel.
3. Após retirar o fragmento dos tubos e colocá-lo na forma, conte uma hora. Durante o processo de transferência do fragmento a parafina pode solidificar, assim, comece a cronometrar o tempo somente a partir do momento que toda parafina contida nas formas esteja em estado líquido.
4. Realize o 2º banho de parafina transferindo o fragmento e sua identificação com o auxílio da pinça para uma segunda forma (Figura 3A) contendo uma nova parafina e, seguindo os detalhes descritos no item 2, comece a contar mais 1 hora.

5. Fabrique uma forminha de papel (Figura 3B) conforme descrito no Anexo I e demonstrado no Vídeo 1 (<[https://youtu.be/PYSaIJ02\\_H8](https://youtu.be/PYSaIJ02_H8)>).

6. Transfira o fragmento para o centro da forminha de papel contendo um pouco de parafina fundida e, em seguida, preencha-a com parafina deixando-a solidificar a temperatura ambiente de um dia para o outro. O bloco de parafina contendo o fragmento de tecido deverá ser mantido em temperatura ambiente até que endureça (Figuras 3C e 3D).

7. Retire o bloco de parafina da forminha de papel e desbaste-o com o auxílio de um estilete para sua adaptação ao micrótomo. Ao desbastar o bloco tente obter um quadrado de aproximadamente 1 cm x 1 cm x 0,7 cm (comprimento, largura, profundidade) como apresentado nas Figuras 3C e 3D para que os fragmentos não saiam tortos ao serem cortados.

#### Recomendações:

- A estufa usada para fusão da parafina deve ser monitorada para que não exceda a temperatura de 65 °C a 70 °C e queime o fragmento.
- Antes do início da desidratação coloque na estufa uma quantidade duplicada (em relação ao número de amostras) de formas preenchidas com parafina, para que no momento do 2º banho a parafina já esteja fundida.
- As passagens do fragmento pela parafina e a abertura e fechamento da estufa devem ser realizados rapidamente para não alterar a temperatura e solidificar a parafina. Se a parafina solidificar aguarde ela fundir novamente para contar o tempo da inclusão.
- A parafina dos banhos pode ser reutilizada desde que seja filtrada, porém dê preferência a uma nova partida para a etapa de inclusão.
- Recomenda-se deixar o bloco de parafina com a amostra de tecido dentro de uma sacola plástica lacrada a temperatura entre -1 °C e -4 °C, para que se torne mais firme, até a realização dos cortes.

#### Cortes

Os cortes histológicos consistem na secção de blocos com material incluído para obtenção de secções suficientemente delgadas para permitir a penetração da luz. Os blocos histológicos são cortados em finas lâminas com auxílio do micrótomo cuja unidade de medida, o micrômetro ( $\mu$ m), corresponde à milésima parte do milímetro (mm). A espessura dos cortes no micrótomo pode variar entre 1  $\mu$ m a 50  $\mu$ m, porém as dimensões

mais utilizadas na microscopia óptica para o tecido ovariano são de 5  $\mu\text{m}$  e 7  $\mu\text{m}$ .

#### Material:

- Micrótomo manual rotativo, navalha de baixo perfil, lápis grafite, placa aquecedora ou agitador magnético com aquecimento, pipeta Pasteur, álcool 70%, pincel chato (nº 4), água destilada, substância adesiva (albumina ou clara de ovo + glicerina na proporção de 1:1), papel toalha, estilete, lâmina de ponta fosca 26 mm x 76 mm, béquer.

#### Procedimento:

1. Deixe as lâminas por 24 horas no álcool 70% antes do procedimento.

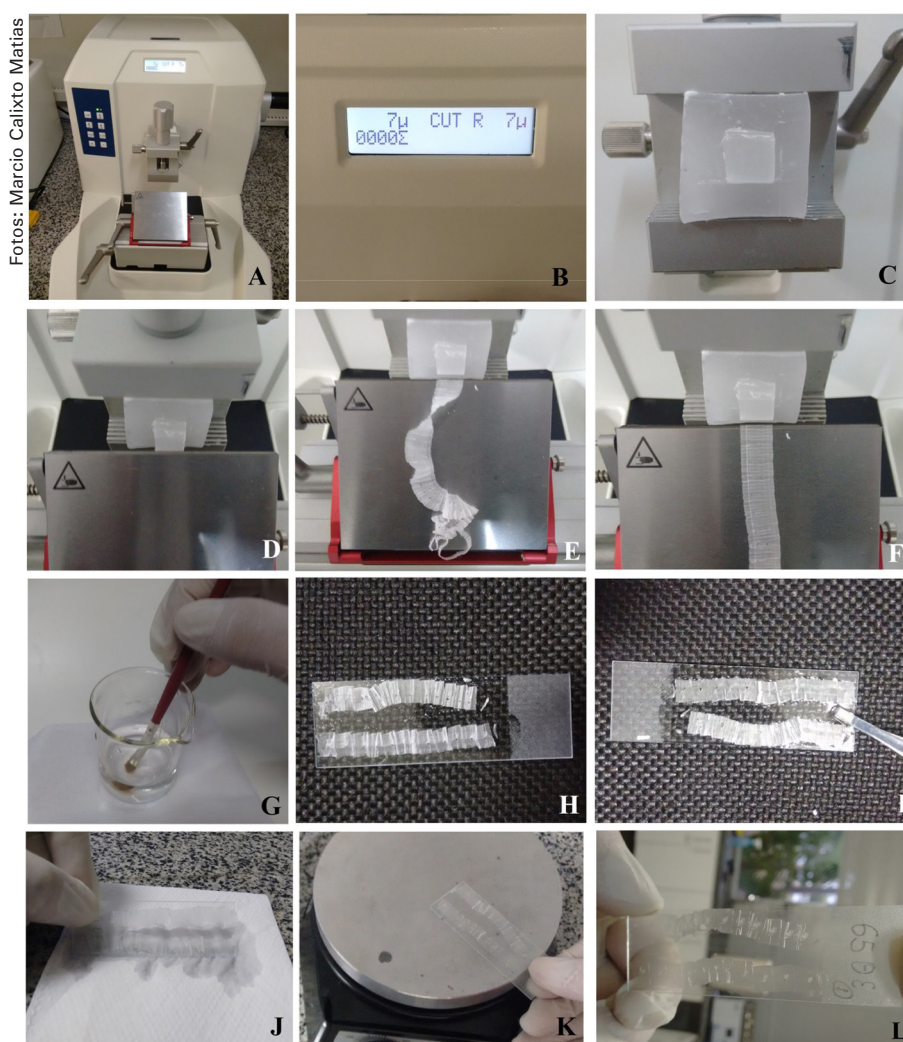
2. Forre a bancada de trabalho com papel toalha.

3. Seque as lâminas com papel toalha e identifique-as com lápis de acordo com a identificação da amostra descrita no bloco.

4. Com as mãos calçadas com luvas, use o dedo indicador para passar uma fina camada da substância adesiva sobre as lâminas para facilitar a fixação do fragmento.

5. Coloque as lâminas sobre o papel toalha.

6. Ajuste o micrótomo para cortar fragmentos numa espessura de 7  $\mu\text{m}$  (Figuras 4A e 4B) e encaixe a navalha específica.



**Figura 4.** Procedimento de preparação do corte e confecção da lâmina de tecido para histologia. (A) Micrótomo rotativo. (B) Espessura do corte 7 $\mu\text{m}$ . (C) Bloco encaixado ao micrótomo. (D) Bloco em contato com a navalha. (E) Obtenção de fita de forma incorreta. (F) Obtenção de fita de forma correta. (G) Umedecimento do pincel. (H) Fita sobre a lâmina. (I) Lâmina hidratada. (J) Redução do excesso de água da lâmina. (K) Lâmina exposta à chapa quente. (L) Lâmina com corte finalizado.

7. Busque o bloco desejado no congelador e encaixe-o no micrótomo, ajustando para ficar o mais centralizado possível (Figura 4C).
8. Aproxime o bloco à navalha e destrave o volante do micrótomo para realizar o corte (Figura 4D).
9. Gire o volante cortando o bloco e observando se a série de cortes está saindo de forma retilínea (Figuras 4E e 4F).
10. Realize os cortes até chegar ao fragmento do tecido desprezando a parafina sem a amostra.
11. Corte uma série de fatias da amostra em formato de uma fita e, coloque dois segmentos de fita paralelamente na lâmina previamente identificada.
12. Fixe as fitas utilizando um pincel umedecido em água destilada. Toque o pincel na parte superior do fragmento cortado e, delicadamente, coloque a fita sobre a lâmina (Figuras 4G e 4H).
13. Hidrate os fragmentos cortados com água destilada utilizando a pipeta Pasteur, aproveitando para ajustá-los na lâmina (Figura 4I).
14. Escorra o excesso de água destilada da lâmina no papel toalha inclinando-a com cuidado para o fragmento não deslizar (Figura 4J).
15. Leve a lâmina para a placa aquecedora a 70 °C colocando-a e retirando-a imediatamente por aproximadamente 10 vezes como demonstrado no Vídeo 2 (<[https://youtu.be/ZDHNEAy\\_d98knoU](https://youtu.be/ZDHNEAy_d98knoU)>) a fim de aumentar a adesão do corte à lâmina (Figura 4K).
16. Após o procedimento anterior observe se a lâmina está de acordo com a Figura 4L.

#### Recomendações:

- Se a temperatura do local de processamento for elevada recomenda-se a utilização de aparelho de ar-condicionado para resfriar o ambiente.
- Não deve haver qualquer tipo de corrente de ar até mesmo de respiração forte do operador no momento da captura do corte para montagem na lâmina.

#### Coloração

É a técnica tintorial efetuada por processos físico-químicos e empregada para facilitar o estudo dos tecidos sob microscopia, sendo de importância fundamental em histologia, pois os tecidos não tratados têm pouca diferenciação óptica. Os corantes mais comumente empregados nas

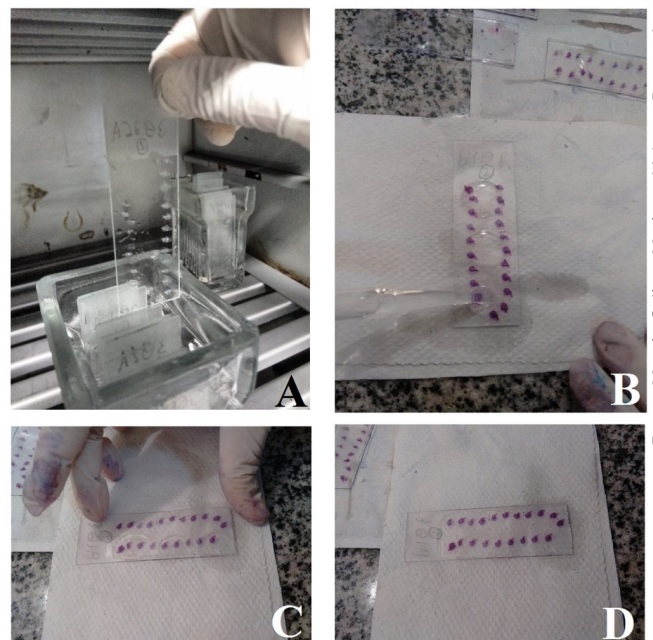
colorações para histologia ovariana e oocitária são a hematoxilina e a eosina (VENDOLA et al., 1999; NILSSON; SKINNER, 2002). A hematoxilina cora em azul ou violeta o núcleo das células e outras estruturas ácidas tais como porções do citoplasma ricas em RNA. A eosina, por outro lado, cora o citoplasma e o colágeno em cor-de-rosa (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

#### Material:

- Estufa, cronômetro, capela de exaustão de gases, cuba para coloração com ranhuras, funil, álcool etílico a 100%, 95% e 70%, eosina (20 g eosina + 100 mL água destilada), hematoxilina de Harris conforme orientações descritas por Caputo et al. (2010), álcool-ácido (1 mL de ácido clorídrico + 99 mL de álcool 70%), xilol, água destilada, luvas térmicas, parafina histológica com ponto de fusão entre 58 °C e 60 °C, lamínula de 24 mm x 50 mm, substância adesiva (Entellan® - solução livre de água a base de tolueno e xilol), pipeta de Pasteur descartável e, papel toalha.

#### Procedimento:

1. Organize as lâminas nas ranhuras da cuba e leve-as para a estufa a 70 °C por aproximadamente 30 minutos, ou até que a parafina esteja completamente derretida (Figura 5A).



**Figura 5.** Procedimento de coloração dos fragmentos de tecido montados sobre lâminas para histologia. (A) Lâmina com parafina derretida. (B) Lâmina com substância adesiva (Entellan®). (C) Lamínula sobre a lâmina. (D) Lâmina corada e finalizada.

2. Organize a capela de exaustão de gases com os reagentes e soluções a serem utilizados, na seguinte ordem: xilol (1º banho), xilol (2º banho), álcool 100% (1º banho), álcool 95% (1º banho),



álcool 70%, hematoxilina, álcool-ácido, eosina, água destilada, álcool 95% (2º banho), álcool 100% (2º banho), álcool 100% (3º banho), álcool 100% + xilol (1:1), xilol (3º banho), xilol (4º banho).

3. Com auxílio de luva térmica retire a cuba com as lâminas da estufa e leve para a capela de exaustão de gases.

4. Coloque o xilol (1º banho) na cuba pela lateral até cobrir as lâminas de forma lenta para que o fragmento de ovário não se desprenda. Deixe o xilol agir por 10 minutos e depois o devolva para seu frasco com auxílio do funil.

5. Repita as instruções do item anterior para o xilol (2º banho).

6. Coloque o álcool 100% (1º banho) cuidadosamente na cuba pela lateral até cobrir as lâminas. Deixe o álcool agir por 3 minutos e depois o devolva para o seu frasco com auxílio do funil.

7. Repita as instruções do item anterior para o álcool 95% (1º banho) e o álcool 70%.

8. Preencha a cuba com água corrente deixe em repouso por 3 minutos e em seguida descarte a água.

9. Coloque cuidadosamente a hematoxilina na cuba pela lateral até cobrir as lâminas, deixe agir por 2 minutos e a devolva para o seu frasco com auxílio do funil.

10. Coloque cuidadosamente o álcool-ácido na cuba pela lateral até cobrir as lâminas, removendo-o logo em seguida e devolvendo-o para o seu frasco com auxílio do funil.

11. Preencha e realize a lavagem da cuba com água corrente por 10 minutos. O fluxo de água deve ser contínuo e fraco, sem deixar que o material se desprenda da lâmina. Em seguida, descarte a água.

12. Coloque a eosina na cuba até cobrir completamente as lâminas, deixe agir por 35 segundos e devolva para o seu frasco com auxílio do funil.

13. Preencha a cuba com água destilada e descarte a água em seguida.

14. Coloque cuidadosamente o álcool 95% (2º banho) na cuba pela lateral até cobrir as lâminas e remova-o logo em seguida devolvendo-o para o seu frasco com auxílio do funil.

15. Repita as instruções do item anterior para o álcool 100% (1º banho).

16. Coloque cuidadosamente o álcool 100% (3º banho) na cuba pela lateral até cobrir as lâminas, deixe agir por 2 minutos e devolva-o para o seu frasco com auxílio do funil.

17. Repita as instruções do item anterior para o álcool 100% + xilol.

18. Lave o funil com água corrente e o seque com papel toalha.

19. Coloque cuidadosamente o xilol (3º banho) na cuba pela lateral até cobrir as lâminas, deixe agir por 3 minutos e devolva-o para o seu frasco com auxílio do funil.

20. Coloque cuidadosamente o xilol (4º banho) na cuba pela lateral até cobrir as lâminas, deixe agir por 2 minutos e, então, devolva-o para o seu frasco com auxílio do funil.

21. Inicie a montagem das lâminas deixando-as no xilol (4º banho) até finalização do processo.

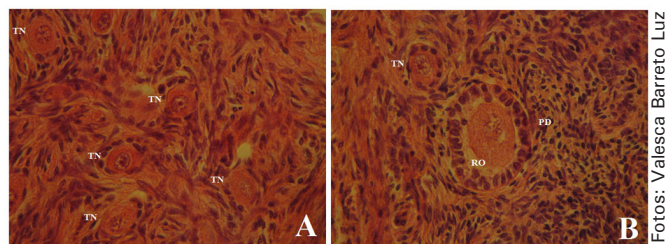
22. Com auxílio de uma pinça, retire a lâmina da cuba escorrendo o excesso do xilol e, deite-a sobre um papel toalha.

23. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur descartável, goteje três gotas da substância adesiva (Entellan®) diretamente na superfície da lâmina que contém o fragmento ovariano e que está sua identificação (Figura 5B).

24. Coloque a lamínula sobre a lâmina. No caso de formação de bolhas de ar, pressione levemente a lamínula com auxílio de uma pinça (Figura 5C).

25. Deixe as lâminas dentro da capela de exaustão por no mínimo 2 horas antes de iniciar a sua leitura para que o xilol presente nas lâminas seja evaporado e o seu odor forte não cause náuseas a quem está lendo as lâminas (Figura 5D).

26. Verifique a qualidade da coloração das estruturas (Figuras 6A e 6B).



**Figura 6.** Tecido ovariano corado por hematoxilina-eosina (HE). (A) Folículos de transição normais: TN. (B) Folículo primário degenerado (PD), apresentando retração oocitária (RO), ao lado de folículo de transição normal (TN).



### Recomendações:

- O ambiente que será feito o procedimento não deve, preferencialmente, estar refrigerado com ar-condicionado ou com ventilação intensa.
- Nunca colocar lâminas a mais do que a capacidade de cada cuba para não prejudicar a sua manipulação.
- As luvas usadas pelo operador devem ser brancas. Luvas de outras colorações costumam turvar o xilol após o contato.
- Sempre que lavar o funil enxugá-lo bem não deixando resquícios de água, pois o contato da água com o xilol prejudica suas propriedades. De preferência tenha pelo menos três funis, um para auxiliar as etapas com álcool, outro para o xilol e outro para os corantes.
- É fundamental que, durante a coloração, seja obedecida a sequência de banhos na qual as substâncias foram organizadas na capela de exaustão, para não comprometer a qualidade da coloração histológica. Por exemplo, não utilizar substâncias de 2º banho no 4º banho e vice-versa.

### Considerações Finais

O protocolo histológico de ovários descrito detalhadamente nesta publicação promoveu uma melhoria nos procedimentos laboratoriais para caracterização de tecidos ovarianos de animais sendo aplicado nas atividades de conservação in situ e ex situ de ovinos Santa Inês e na agregação de valores a este recurso genético a exemplo da caracterização dos ovinos da genética *FecGE*. As informações presentes nesta publicação permitem que o processamento histológico de tecido ovariano seja facilmente replicado. O conteúdo técnico compilado neste documento pode ajudar outras equipes de trabalho que estão iniciando as atividades com histologia a estabelecerem seus próprios protocolos a fim de produzir lâminas de qualidade que, conseqüentemente, permitam leituras claras que gerem interpretações fidedignas e confiáveis.

### Referências

- AMORIM, C. A.; RODRIGUES, A. P. R.; RONDINA, D.; GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; GIORGETTI, A. Cryopreservation of ovine primordial follicles using dimethyl sulfoxide. **Fertility and Sterility**, New York, v.79, p.683-686, 2003.
- AZEVEDO, H.A.; PAIVA, S.R.; MELO, E.O.; SILVA, B.D.M.; OLIVEIRA, A.A.; MUNIZ, E.N. **Estudos da genética *FecGE* na prolificidade de ovinos**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2015. 10 p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros, Documentos, 193). Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/142489/1/Doc-193.pdf>>. Acesso em: 26 out. 2016.
- CAPUTO, L. F. G.; MOTA, E. M.; GITIRANA, L. B. Técnicas citológicas. In: MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G., AMENDOEIRA, M. R. R. (Org.). **Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Rio de Janeiro: EPSJU, 2010. v.2. Disponível em: <[http://www.epsjv.fiocruz.br/sites/default/files/capitulo\\_4\\_vol2.pdf](http://www.epsjv.fiocruz.br/sites/default/files/capitulo_4_vol2.pdf)>. Acesso em: 26 out. 2016.
- DRIANCOURT, M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, Amsterdam, v. 55, n. 6, p. 1211-1239, 2001.
- DRUMMOND, A. E. The role of steroids in follicular growth. **Reproduction Biology and Endocrinology**, London, v. 4, p.16, 2006.
- FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; SILVA, J. R. V. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais: MOIFOPA. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 12 ed. São Paulo: Roca, 2003. p. 303-327
- JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. Histologia básica. In: JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO J. **Aparelho Reprodutor Feminino**. 12 ed. Guanabara koogan, 2013. p. 427-447.
- KNIGHT, P.G.; GLISTER, C. TGF- $\beta$  superfamily members and ovarian follicle development. **Reproduction**, Bethesda, v. 132, p. 191-206, 2006.
- MARTINEZ-MADRID, B.; CAMBONI, A.; DOLMANS, M. M.; NOTTOLA, S.; LANGENDONCKT, A. V.; DONNEZ, J. Apoptosis and ultrastructural assessment after cryopreservation of whole human ovaries with their vascular pedicle. **Fertility and Sterility**, New York, v. 87, p. 1153-1165, 2007.

MATOS, M. H. T.; SILVA, J. R. V.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Técnicas para avaliação da qualidade de folículos ovarianos pré-antrais cultivados *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 4, p. 433-442, out./dez. 2007.

MOHAMMDPOUR, A. A. Comparative histomorphological study of ovary and ovarian follicles in iranian lori-bakhtiari sheep and native goat. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Dubai, v. 4, n. 10, p. 673-675, 2007.

NILSSON, E. E.; SKINNER, M. K. Growth and differentiation factor-9 stimulates progression of early primary but not primordial rat ovarian follicle development. **Biology of Reproduction**, New York, v. 67, p.1018-1024, 2002.

ORISAKA, M.; TAJIMA, K.; TSANG, B. K.; KOTSUJI, F. Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular development. **Journal of Ovarian Research**, London, v. 2, p. 9, 2009.

SILVA, J. R. V.; FERREIRA, M. A. L.; COSTA, S. H. F.; SANTOS, R. R.; CARVALHO, F. C. A.; RODRIGUES A. P. R, LUCCHI, C. M.; BÃO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Degeneration rate of preantral follicles in the ovaries of goats. **Small Ruminant Research**, New York, v. 43, p. 203-209, 2002.

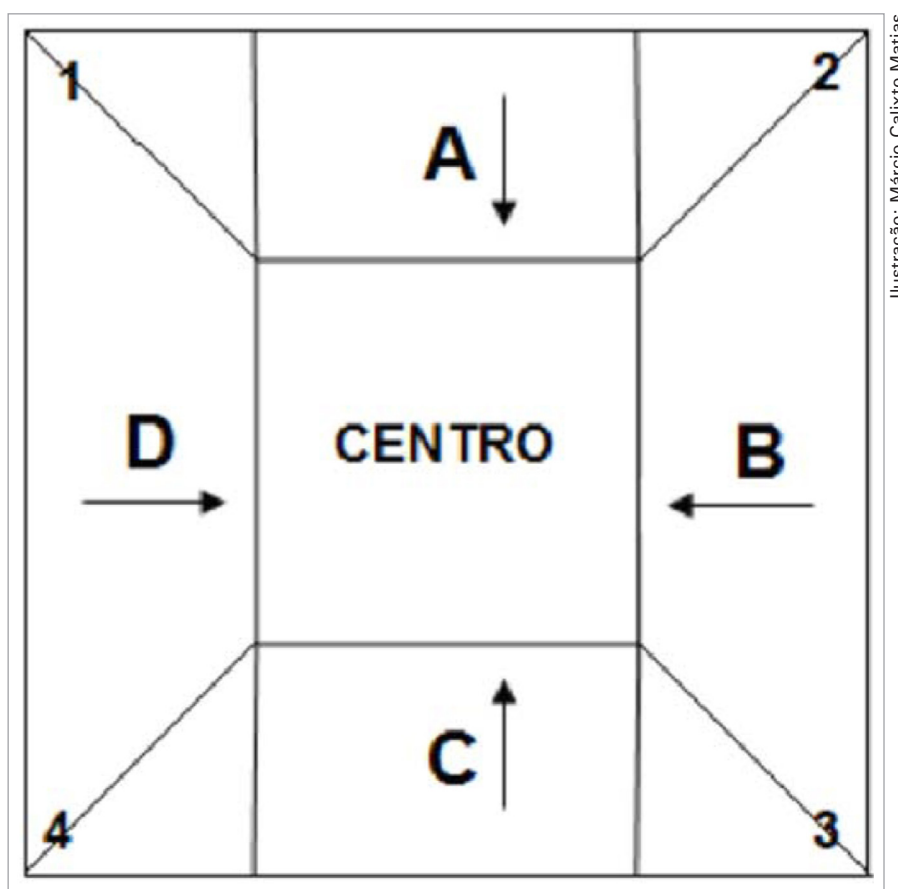
VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, Amsterdam, v. 63, p. 1717-1751, 2005.

VENDOLA, K.; ZHOU, J.; WANG, J.; FAMUYIWA, O. A.; BIEVRE, M.; BONDY, C. A. Androgens promote oocyte insulin-like growth factor I expresión and initiation of follicle development in the primate ovary. **Biology of Reproduction**, New York, v. 61, p. 353-357, 1999.

## Anexo I

### Procedimento para montar a forminha de papel para armazenar os blocos de parafina

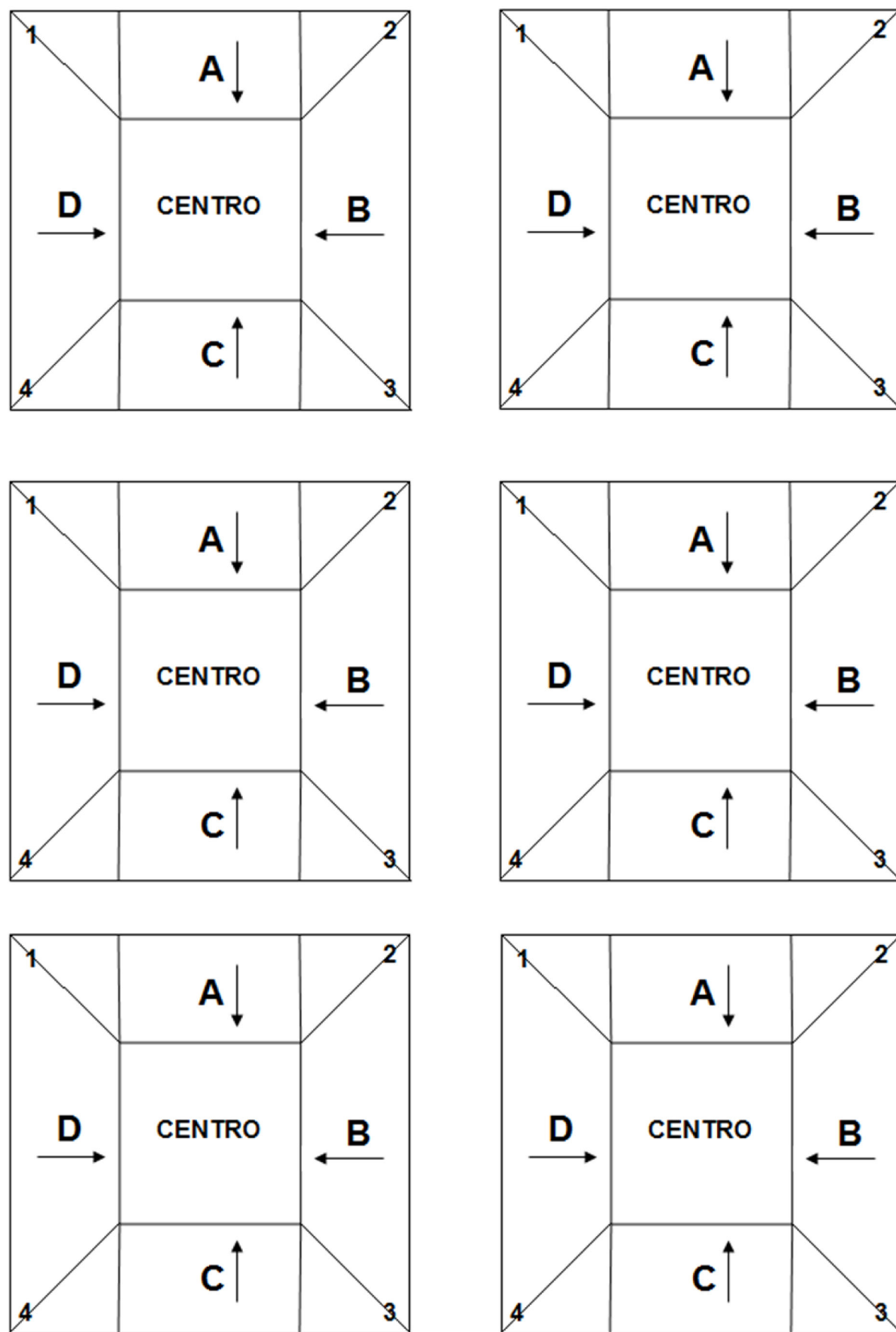
1. Seguindo as instruções baseadas na Figura 1, imprima a Figura 2 em papel sulfite e recorte as figuras.
2. Dobre a face A e C no sentido das suas respectivas setas em direção ao centro.
3. Dobre a face B e D no sentido das suas respectivas setas em direção ao centro.
4. Dobre as extremidades por ordem numérica nas linhas, formando um cubo com 4 pontas (numeradas), linha 1 (entre a face D e A), linha 2 (entre as faces A e B), linha 3 (entre a face B e C), linha 4 (entre a face C e D).
5. Dobre as pontas 1 e 2 para trás da face A e as pontas 3 e 4 para trás da face C.



**Figura 1.** Modelo para confecção da forminha de papel para processamento histológico de ovários.



Ilustração: Márcio Calixto Matias



**Figura 2.** Folha para impressão e confecção das forminhas de papel para processamento histológico de ovários.

## Anexo III

**Tabela 1.** Sequência do processamento histológico para ser impressa e colada ao lado da capela de exaustão de gases.

| Ordem | Etapas       | Reagente                       | Duração         |
|-------|--------------|--------------------------------|-----------------|
| 1     | Fixação      | Carnoy                         | 12 horas        |
| 2     | Desidratação | Álcool Etílico 70%             | Mínimo 24 horas |
| 3     |              | Álcool Etílico 80%             | 1 hora          |
| 4     |              | Álcool Etílico 95%             | 1 hora          |
| 5     |              | Álcool Etílico 100% (1º banho) | 1 hora          |
| 6     |              | Álcool Etílico 100% (2º banho) | 1 hora          |
| 7     |              | Álcool Etílico 100% (3º banho) | 1 hora          |
| 8     | Diafanização | Xilol (1º banho)               | 1 hora          |
| 9     |              | Xilol (2º banho)               | 1 hora          |
| 10    | Impregnação  | Parafina (1º banho)            | 1 hora          |
| 11    |              | Parafina (2º banho)            | 1 hora          |
| 12    | Inclusão     | Parafina                       |                 |

**Comunicado  
Técnico, 191**

**Embrapa Tabuleiros Costeiros**  
Endereço: Avenida Beira Mar, 3250,  
CEP 49025-040, Aracaju - SE  
Fone: (79) 4009-1344  
Fax: (79) 4009-1399  
[www.embrapa.br](http://www.embrapa.br)  
[www.embrapa.br/fale-conosco](http://www.embrapa.br/fale-conosco)



1ª edição  
PDF (2016)

**Comitê de  
publicações**

**Presidente:** Marcelo Ferreira Fernandes  
**Secretária-executiva:** Raquel Fernandes de Araújo Rodrigues  
**Membros:** Ana Veruska Cruz da Silva Muniz, Carlos Alberto da Silva, Elio Cesar Guzzo, Hymerson Costa Azevedo, João Gomes da Costa, Josué Francisco da Silva Junior, Julio Roberto Araujo de Amorim, Viviane Talamini e Walane Maria Pereira de Mello Ivo

**Expediente**

**Supervisora editorial:** Raquel Fernandes de Araújo Rodrigues  
**Tratamento das ilustrações:** Joyce Feitoza Bastos  
**Editoração eletrônica:** Joyce Feitoza Bastos